



GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

Estudio de inmunotinción de PD-L1 y CD8 en
carcinoma de células renales de célula clara
Immunohistochemical study of PD-L1 and
CD8 in clear cell renal cell carcinoma

Autor: D. Jaime Hoz Fernández

Director-es: Dr. José Javier Gómez Román
Dra. Ainara Azueta Etxebarria

Santander, 2019

ÍNDICE

Agradecimientos.....	5
Resumen.....	6
Introducción: el carcinoma de células renales de célula clara y la inmunoterapia.....	7
Hipótesis/objetivos.....	13
Material y métodos.....	14
Resultados.....	16
Discusión.....	20
Conclusión.....	21
Referencias.....	22

AGRADECIMIENTOS

Gracias a las personas del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla: a los técnicos que realizaron las tinciones, a los adjuntos, a los residentes que me hicieron compañía en la sala de microscopios, y especialmente a la Dra. Azueta y al Dr. Gómez por dedicarme su tiempo y esfuerzo de forma desinteresada a lo largo de estos meses.

A mi familia y a mis amigos, por estar ahí.

RESUMEN

El carcinoma de células renales de célula clara (CCRCC) es el principal tumor maligno renal. En los últimos años se ha introducido la inmunoterapia con inhibidores de puntos de control inmune para su tratamiento, concretamente los anticuerpos anti-PD-1 y anti-PD-L1.

Hemos realizado un estudio inmunohistoquímico de la expresión de PD-L1 y CD8 en 49 casos de CCRCC en el afán de mejorar la comprensión sobre la expresión de esta proteína en este tipo concreto de tumor y en su microambiente tumoral para potencialmente mejorar la valoración de pacientes potencialmente tratables con inmunoterapia dirigida contra esta molécula.

Hemos encontrado un mayor número de casos con positividad inmunohistoquímica para PD-L1 tanto en linfocitos intratumorales y peritumorales como en las células propias del tumor en los casos de tumor de alto grado histológico, así como un mayor número de casos que expresan PD-L1 en los linfocitos intratumorales frente a los que expresan PD-L1 en los linfocitos peritumorales.

También hemos encontrado una asociación positiva entre la presencia de linfocitos T CD8+ y la expresión de PD-L1 en las células tumorales, así como entre la presencia de linfocitos T CD8+ y la expresión de PD-L1 en estos mismos.

Palabras clave: carcinoma de células renales de célula clara, inmunoterapia, inhibidores de puntos de control inmune, PD-L1, linfocitos T CD8+.

Clear cell renal cell carcinoma is the main malignant renal tumor. Immunotherapy with checkpoint inhibitors has been introduced for its treatment in recent years, specifically with anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies.

We have performed an immunohistochemical study of the expression of PD-L1 and CD8 in 49 cases of CCRCC in an effort to improve current understanding of the expression of this protein in this particular type of tumor and in its tumor microenvironment in order to improve the assessment of potentially treatable patients with immunotherapy targeting this molecule.

We have found a greater number of cases with immunohistochemical positivity for PD-L1 in both intratumoral and peritumoral lymphocytes and in the tumor's cells in the cases of high histological grade, as well as a greater number of cases expressing PD-L1 in intratumoral lymphocytes versus those expressing PD-L1 in peritumoral lymphocytes.

We have also found a positive association between the presence of CD8 + T cells and the expression of PD-L1 in tumor cells, as well as between the presence of CD8 + T cells and the expression of PD-L1 in them.

Keywords: clear cell renal cell carcinoma, immunotherapy, immune checkpoint inhibitors, PD-L1, CD8+ T cells

INTRODUCCIÓN: EL CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES DE CÉLULA CLARA Y LA INMUNOTERAPIA

El carcinoma de células renales de célula clara es el sexto cáncer más diagnosticado en hombres y el décimo en mujeres a nivel mundial, representando el 5% y el 3% de todos los diagnósticos oncológicos, respectivamente. La incidencia del CCRCC ha ido aumentando en las últimas décadas, sobre todo en los países con mayor nivel socioeconómico, en parte por el aumento de detección de masas renales en pruebas de imagen realizadas por otras razones. A pesar de que la mayoría de estos tumores son de un tamaño pequeño al diagnóstico, la enfermedad localmente avanzada sigue siendo diagnosticada en un importante número de pacientes, con un 17% de los pacientes presentando metástasis en otros órganos en el momento del diagnóstico. En Europa y Norteamérica el riesgo de desarrollar CCRCC a lo largo de la vida está en torno al 1,3 y 1,8%. El CCRCC produce 140.000 muertes al año, siendo la treceava causa de muerte por cáncer a nivel mundial. Los principales factores de riesgo de desarrollarlo son la obesidad, el tabaquismo, la hipertensión arterial y la enfermedad renal quística adquirida ¹. El CCRCC posee un patrón vascular típico y una patogenia característica, con la inactivación del gen *VHL* (Von Hippel-Lindau) y el consecuente aumento de actividad del factor inducible por hipoxia. El sistema de graduación de este tumor más ampliamente aceptado en la actualidad es el de la WHO/International Society of Urological Pathology (ISUP), que distingue cuatro grados histológicos (antiguamente denominados grados de Fühman) ² según el tamaño nucleolar de las células tumorales (grados 1-3), el grado de pleomorfismo nuclear, la presencia de células gigantes multinucleadas o presencia de diferenciación rabdoide o sarcomatoide (grado 4) ³ (Tabla 1). Los tumores de grados 1 y 2 se consideran tumores de bajo grado y los de 3 y 4 de alto grado.

	Diámetro nuclear	Forma del núcleo	Nucleolo
Grado 1	Pequeño (aprox. 10 micras)	Redondo, uniforme	Ausente
Grado 2	Más grande (aprox. 15 micras)	Irregularidades en su contorno	Visible a 400x
Grado 3	Más grande (aprox. 20 micras)	Irregularidades evidentes	Visible a 100x
Grado 4	Como en el grado 3, con núcleos bizarros y multilobulados y células fusiformes		

Tabla 1. Graduación en CCRCC ².

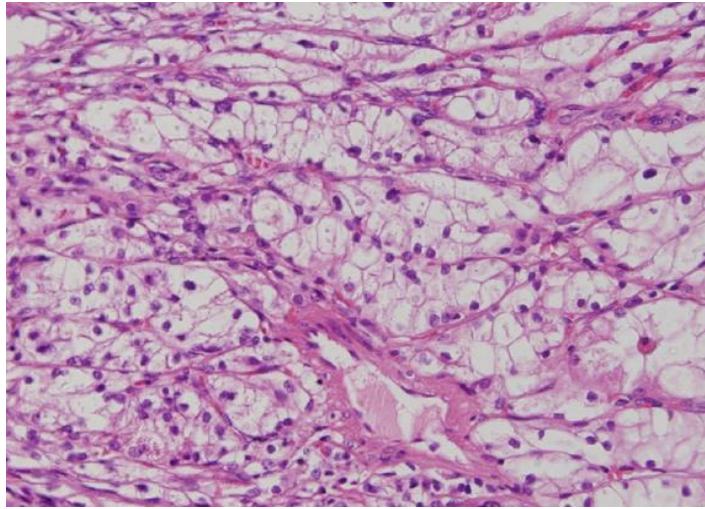


Figura 1. Tinción hematoxilina-eosina (H-E). Carcinoma de células renales de célula clara, Grado 1.

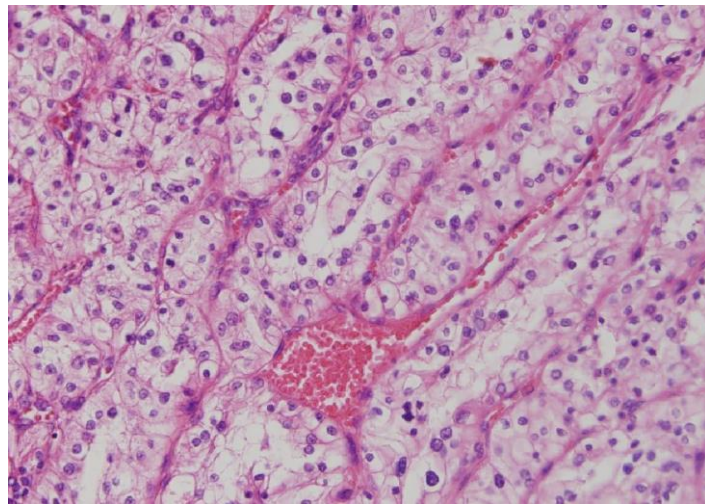


Figura 2. Tinción H-E. Carcinoma de células renales de célula clara, Grado 2.

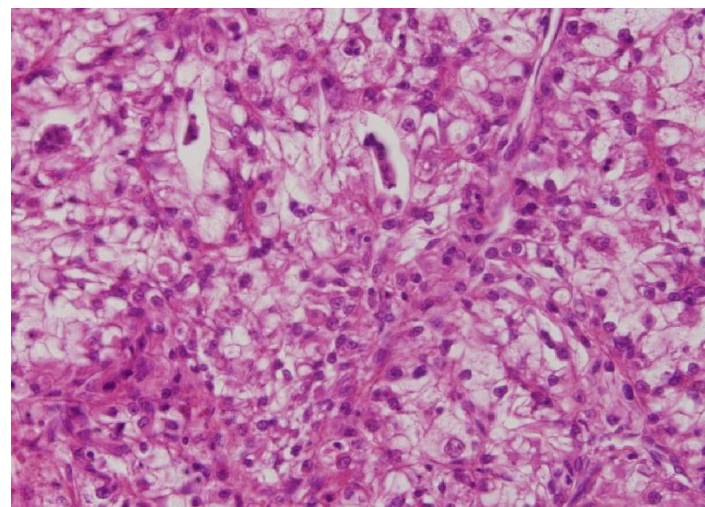


Figura 3. Tinción H-E. Carcinoma de células renales de célula clara, Grado 3.

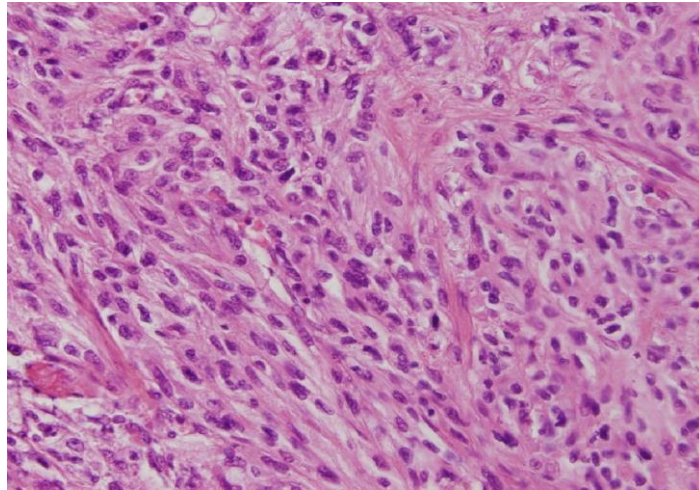


Figura 4. Tinción H-E. Carcinoma de células renales de célula clara, Grado 4.

Las opciones terapéuticas para el CCRCC se han mantenido sin muchos cambios durante los últimos 30 años, con la cirugía como pilar fundamental. En los últimos 5 años esto ha cambiado tras la aprobación de las agencias reguladoras de terapias dirigidas frente a PD-1/PD-L1 ⁴.

La inmunoterapia es un tipo de tratamiento para el cáncer que estimula las defensas naturales del cuerpo a fin de combatir el cáncer. Se viene utilizando desde el siglo pasado, como el utilizado en el cáncer de vejiga no músculo infiltrante con el uso de la vacuna BCG desde 1976 ⁵. En este contexto, los inhibidores de los puntos de control inmune están produciendo un cambio de paradigma en el tratamiento del cáncer ⁶.

Las moléculas de punto de control inmune, principalmente la proteína de muerte programada 1 (programmed death 1, PD-1) y la proteína asociada a linfocitos T citotóxicos-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4, CTLA-4) son moléculas de membrana que fisiológicamente bloquean la activación de los linfocitos T para evitar la autoinmunidad y limitar los efectos autolesivos en los tejidos del huésped en el contexto de la respuesta inflamatoria a infecciones y a otros agentes lesivos. PD-1 y CTLA-4 se expresan de forma distinta y en distintos momentos de la respuesta inmune (Tabla 2). CTLA-4 aparece de forma constitutiva en los linfocitos T reguladores y de forma temporal en gran parte del resto de linfocitos T en las primeras fases de su activación (primeras 24-48 horas). En contraste, PD-1 se expresa en linfocitos T efectores y de memoria en un momento más tardío de su activación (después de las 72 horas), en el que la selección y maduración clonal ante el antígeno específico ha progresado. Debido a estas diferencias, PD-1 y CTLA-4 controlan distintos aspectos de la respuesta inmune: CTLA-4 tiene un papel en la presentación antigénica en los órganos linfoides secundarios, mientras que PD-1 regula la actividad citotóxica de los linfocitos T en el sitio de la inflamación. Otra diferencia significativa puede verse en el fenotipo de sus respectivos modelos en ratones knockout: la autoinmunidad en ratones carentes de CTLA-4 aparece rápidamente y es sistémica y grave ⁷. Mientras que en ratones sin PD-1 es retardada, organoespecífica y más moderada ^{8,9}. Es un fenómeno que se reproduce en humanos al tratarlos con anticuerpos que bloquean la acción de estas proteínas: las

reacciones adversas secundarias a la administración de anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 son más graves y frecuentes que las del tratamiento con anticuerpos anti-PD-1 y anti-PD-L1 ^{4, 10}.

Rutas de control	PD-1	CTLA4
Receptor	Células T activadas, B, NK	Células T activadas
Ligandos	PD-L1 (B7-H1), PD-L2 (B7-DC)	B7.1 (CD80), B7.2 (CD86)
Mecanismos de modulación inmune	Suprime la actividad de los linfocitos T en tejidos	Impide la activación de células T
	Se expresa en linfocitos T reguladores y promueve la inmunosupresión	Interacciona con linfocitos T reg y estimula su acción inmunosupresora
	Limita la actividad de células B y NK	Disminuye la actividad de linfocitos T CD4+
	Interacciona con CD80	Compite con CD28

Tabla 2. Comparación de la expresión y función de las proteínas PD-1 y CTLA-4 en las células del sistema inmune ¹¹.

La señalización de puntos de control inmune puede ser utilizada por los tumores para escapar a la vigilancia inmunológica del huésped ¹² y los inhibidores de los puntos de control inmune son capaces de estimular la inmunidad antitumoral estimulando la actividad citotóxica intrínseca de estas células, permitiendo que reaccionen contra los antígenos tumorales.

El PD-1 se identificó en 1992 por Honjo y colegas de la Universidad de Kyoto ¹³. Los estudios realizados en animales mostraron que el bloqueo de PD-1 podía inhibir la tumorigénesis y el desarrollo de metástasis. A partir de estos resultados empezaron a desarrollarse anticuerpos monoclonales frente al PD-1 humano con intención terapéutica, llegando a comercializarse el nivolumab (también conocido como BMS-936558, MDX-1106 u ONO-4538) en 2014 para el tratamiento del melanoma tras comenzar sus ensayos clínicos fase I en 2006 (Figura 5) y posteriormente incluyéndose en ficha técnica para el carcinoma de células renales de célula clara, habiéndose demostrado también eficaz en el cáncer de pulmón no microcítico, en tumores sólidos de cabeza y cuello, y otros. Actualmente disponemos del nivolumab y el pembrolizumab como anticuerpos monoclonales anti-PD-1 y del atezolizumab, el durvalumab y el avelumab como anticuerpos anti-PD-L1. En este momento se están llevando a cabo varios ensayos clínicos fase III en distintos tipos de tumores utilizando estos anticuerpos

en monoterapia o combinados con otros fármacos antineoplásicos, con resultados, hasta el momento, esperanzadores ¹⁴.

El tratamiento contra PD-1 y PD-L1 tiene varias ventajas respecto al uso de otros anticuerpos monoclonales frente al cáncer: el bloqueo de PD-1 y PD-L1 puede ser eficaz en varios tipos de tumores, ya que su afinidad no depende de antígenos específicos del tumor; su efecto es potencialmente prolongado incluso si las células tumorales continúan mutando, ya que la diana de estos anticuerpos también está presente en linfocitos; y como ya indicamos, presenta menor toxicidad que el uso de bloqueadores de CTLA-4 ⁶.

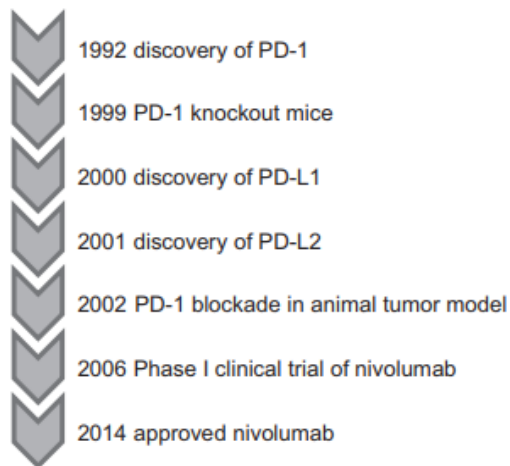


Figura 5. Historia en la investigación del PD-1 ⁶.

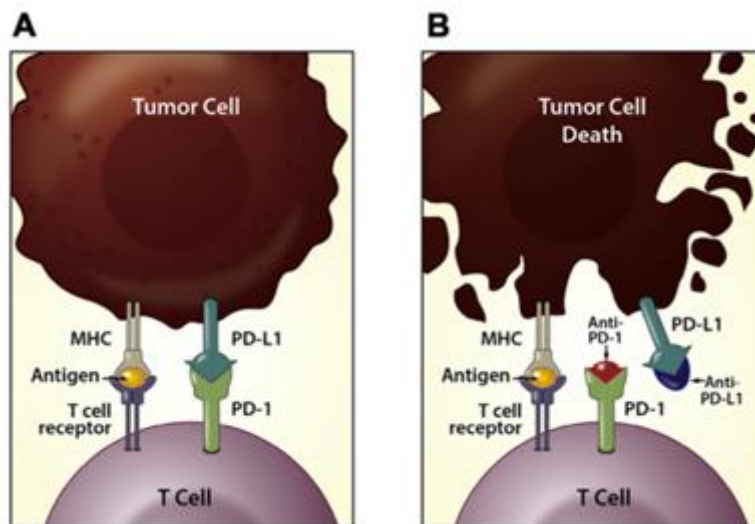


Figura 6. Mecanismo de unión de los anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 y anti-PD-1 en el ambiente tumoral ¹⁵.

Se ha propuesto que una alta expresión de PD-L1 y una alta densidad de linfocitos infiltrantes tumorales (TILs) CD8+ define un tipo de microambiente tumoral predictivo

de respuesta a los inhibidores del punto de control inmune ^{4, 16} aunque los datos se han cuestionado dado que las metodologías han sido difíciles de reproducir.

En esta clasificación se proponen 4 posibles situaciones de microambiente tumoral según la expresión de PD-L1 y la presencia o no de infiltrado linfocitario significativo (Figura 7). En la situación tipo I, existe una resistencia a la respuesta inmune adaptativa en la que tanto el tumor como los TILs expresan PD-L1. En la tipo II hay una ignorancia inmunológica hacia el tumor, sin expresión de PD-L1 en las células tumorales o los TILs. En la tipo III aparece una expresión constitutiva de PD-L1 por parte del tumor y una ausencia de infiltrado linfocitario significativo. En la tipo IV existe infiltrado linfocitario y no hay expresión de PD-L1 pero sin embargo hay tolerancia inmune, lo que nos hace pensar en la presencia de otras vías inhibitorias de la respuesta inmune. La proporción de tumores humanos que pueden clasificarse en cada uno de estos tipos de microambiente depende en gran medida del tipo celular del que deriven y de las alteraciones genéticas y epigenéticas concretas que posean.

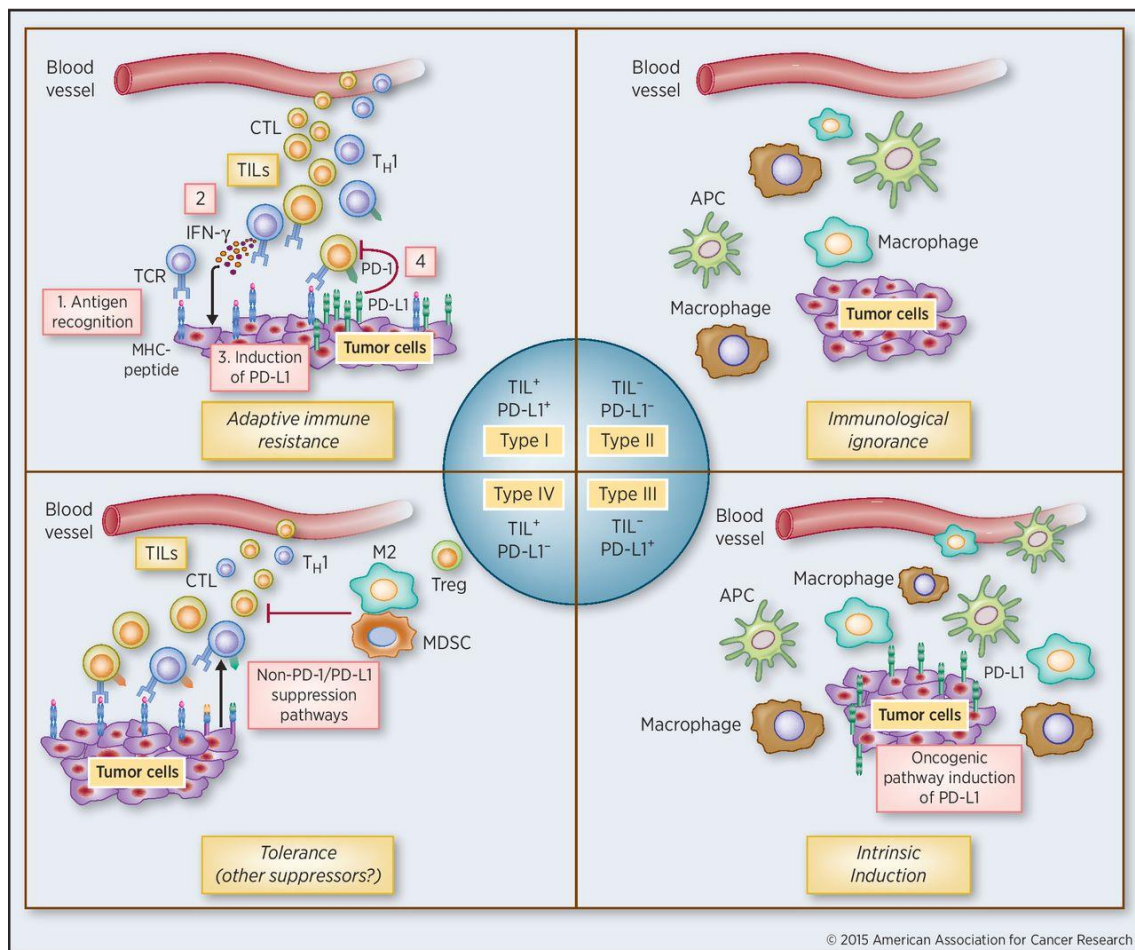


Figura 7. Clasificación tumoral según la presencia de TILs y PD-L1. (Abreviaturas: APC, antigen presenting cell; MDSC, myeloid derived suppressor cell; M2, M2 macrophage; PD-L1, programmed death ligand 1; TCR, T cell receptor; TH1, T helper 1; TIL, tumor-infiltrating lymphocyte). Teng MW, Ngiew SF, Ribas A, Smyth MJ. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. Cancer Res. 2015 ¹⁷.

HIPÓTESIS/OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Definir pacientes candidatos a recibir tratamiento con inhibidores de puntos de control inmune, con los siguientes objetivos concretos:

- 1) Comparar la expresión de PD-L1 en células tumorales en CCRCC de bajo y alto grado histológico.
- 2) Valorar la expresión de PD-L1 en linfocitos CD8+ intratumorales y peritumorales en CCRCC de bajo y alto grado histológico.
- 3) Comparar la expresión de PD-L1 en linfocitos CD8+ intra y peritumorales.
- 4) Correlacionar la expresión de PD-L1 en células tumorales con la presencia de TILs CD8+.
- 5) Analizar el uso del marcador inmunohistoquímico de CD8 como potencial marcador subrogado de PD-L1 en TILs.

MATERIAL Y MÉTODOS

Búsqueda en la base de datos de tumores del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV) 49 casos de carcinoma de células renales de célula clara de piezas extirpadas quirúrgicamente, distribuyéndose los casos entre los distintos grados tumorales, con 6 casos de grado 1, 17 de grado 2, 14 de grado 3 y 12 de grado 4.

Revisión de todas las láminas de cada uno de los casos seleccionados en el archivo del Servicio de Anatomía Patológica del HUMV.

Selección de una lámina representativa (con infiltrado linfocitario tumoral valorable) de cada caso.

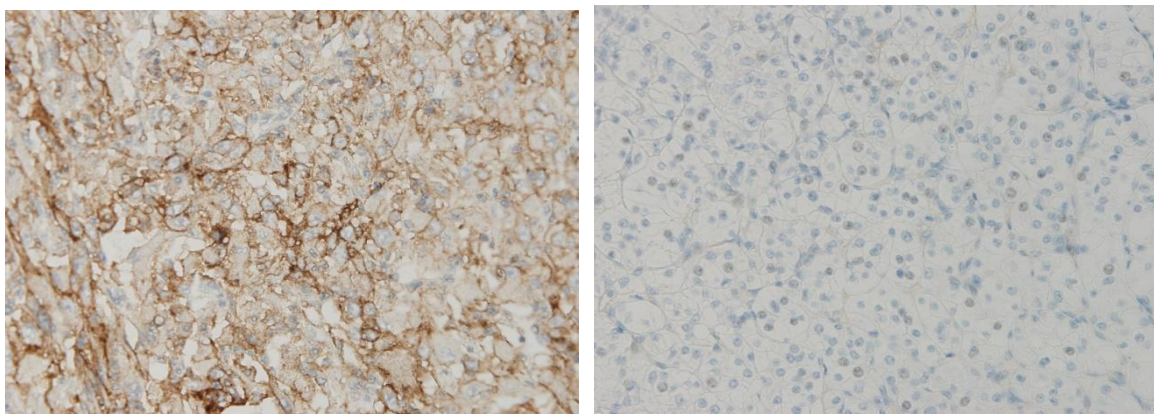
A partir de los cortes de tejido tumoral fijado en formol y parafina de las láminas seleccionadas, realizamos estudio inmunohistoquímico con PD-L1 (Clone 22C3, Agilent), CD45 (Clone 2B11 + PD7/26, Agilent) y CD8 (Clone C8/144B, Agilent).

Cuantificación al microscopio óptico del porcentaje de linfocitos infiltrantes del tumor que expresen CD8.

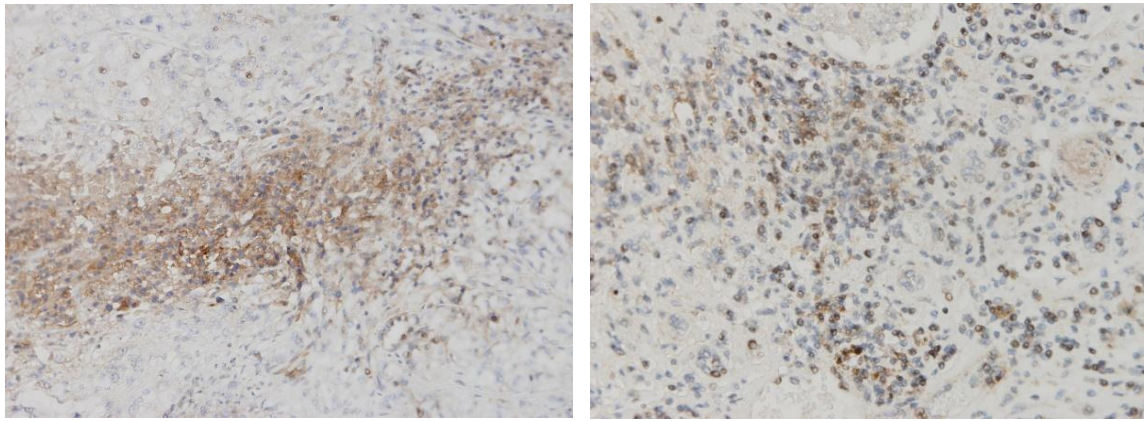
Cuantificación al microscopio óptico del porcentaje de células tumorales que expresen PD-L1 en su superficie, considerando a éstas como aquéllas que se tiñan positivamente con un patrón de membrana de cualquier intensidad.

Cuantificación al microscopio óptico del porcentaje de linfocitos que expresen PD-L1 en su superficie, considerando a éstos como aquéllos que se tiñan positivamente con un patrón citoplasmático fino o de membrana, y distinguiendo entre TILs y linfocitos peritumorales.

Exposición y estudio estadístico de los resultados.



Figuras 8 y 9. Tinción inmunohistoquímica con PD-L1. PD-L1 positivo (izquierda) y negativo (derecha) en células tumorales en CCRCC. x40.



Figuras 10 y 11. Tinción inmunohistoquímica con PD-L1. PD-L1 positivo en linfocitos intratumorales (izquierda) y peritumorales (derecha) en CCRCC. x20.

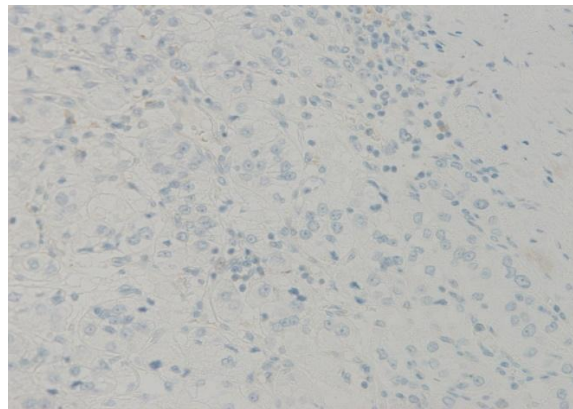


Figura 12. Tinción inmunohistoquímica con PD-1. PD-L1 negativo en linfocitos peritumorales e intratumorales en CCRCC. x20.

RESULTADOS

	Estadio	%CD8+ en TILs	%PDL1+ en TILs CD8+	%PDL1+ en linfocitos CD8+ peritumorales	%PDL1+ en células tumores
GRADO 1					
B-170009408	pT1bNx	30	0	0	0
B-170014572	ptT1a	15	0	0	0
B-170020076	pT1aNx	5	0	0	0
B-18008944	pT1aNx	20	0	0	0
B-12001494	pT2	10	0,5	0	0
B-110014609	pT1a	3	0,5	0	0
GRADO 2					
B-170002012	pT3aNx	10	0	0	0
B-170002234	pT1aNx	10	0	0	0
B-170002318	pT3aN	30	5	0	0
B-170002750	pT3aNx	25	0	0	0
B-170004058	pT3aNx	5	0	0	0
B-170006760	pT3aNx	15	0	0	0
B-170010309	pT1bNx	20	15	0	0
B-170013326	pT1aNx.	40	5	0	30
B-170019668	pT1aNx.	80	3	3	0
B-170020312	pT3aN0	10	3	2	0
B-170020477	pT1aNx	20	0	0	0
B-170027254	pT3aNx	15	1	2	1
B-180000719	pT1aNx	40	5	0	0
B-180002110	pT3aN1	30	5	5	0,5
B-180011343	pT1bNx	20	5	2	0
B-180011738	pT1aNx	20	5	0	0
B-180013516	pT3a	2	0	0	0
GRADO 3					
B-160004367	pT3aN0	10	0	0	0,5
B-160014562	pT3aNx	10	0	0	0
B-170007067	pT3aNx	20	0,5	0	0,5
B-170011504	pT1aNx	5	0	0	0
B-170014448	pT3aNx	30	5	2	10
B-170014992	pT3aNx	60	5	20	3
B-170017769	pT3aNx	20	0	2	5
B-170020857	pT3aN0	5	0,5	0	0
B-170020977	pT1aNx	10	1	0	0
B-170022652	pT3aNx	70	1	0	0
B-170025122	pT3aN0	20	0	3	3
B-170026229	pT3aNx	15	1	3	0
B-180012169	pT3aN0	50	2	1	10
B-180013596	pT3aNx	30	5	0	0

	Estadio	%CD8+ en TILs	%PDL1+ en TILs CD8+	%PDL1+ en linfocitos CD8+ peritumorales	%PDL1+ en células tumorales
GRADO 4					
B-170004869	pT3c	15	1	1	2
B-170012722	pT3aNx	20	2	2	5
B-170013374	pT3aN0	40	5	2	3
B-170015723	pT3aNx	25	0	0	0
B-170019132	pT3apN1	35	1	0,5	25
B-170028044	pT3a N0	40	0,5	3	15
B-180000583	pT3aN0	20	2	0	2
B-160018725	pT3a pN0	40	10	3	20
B-160022445	pT3bNxMx	10	0	0	0
B-15006536	pT3a	25	3	0	0
B-15007581	pT4N0	15	0	0	0
B-120021760	pT1apNx	30	10	0	0

Tabla 3. Resultados del estudio.

En nuestra serie hemos encontrado 3 casos de CCRCC de bajo grado histológico que presentan tinción PD-L1 positiva en células tumorales de entre un total de 23 casos (13%), y 14 casos positivos de entre un total de 26 en el grupo de alto grado (54%):

	Tumor PD-L1+	Tumor PD-L1-	TOTAL
Bajo grado histológico	3	20	23
Alto grado histológico	14	12	26
TOTAL	17	32	49

$\chi^2 = 8,97$; $p < 0,01$

En nuestra serie hemos encontrado 12 casos de CCRCC de bajo grado histológico que presentan tinción PD-L1 positiva en TILs CD8+ de entre un total de 23 casos (52%), y 18 casos positivos de entre un total de 26 en el grupo de alto grado (69%):

	TILs CD8+ PD-L1+	TILs CD8+ PD-L1-	TOTAL
Bajo grado histológico	12	11	23
Alto grado histológico	18	8	26
TOTAL	30	19	49

$\chi^2 = 1,50$; $p = 0,2213$

En nuestra serie hemos encontrado 5 casos de CCRCC de bajo grado histológico que presentan tinción PD-L1 positiva en linfocitos peritumorales CD8+ de entre un total de 23 casos (22%), y 12 casos positivos de entre un total de 26 en el grupo de alto grado (46%):

	Linfocitos CD8+ peritumorales PD-L1+	Linfocitos CD8+ peritumorales PD-L1-	TOTAL
Bajo grado histológico	5	18	23
Alto grado histológico	12	14	26
TOTAL	17	32	49

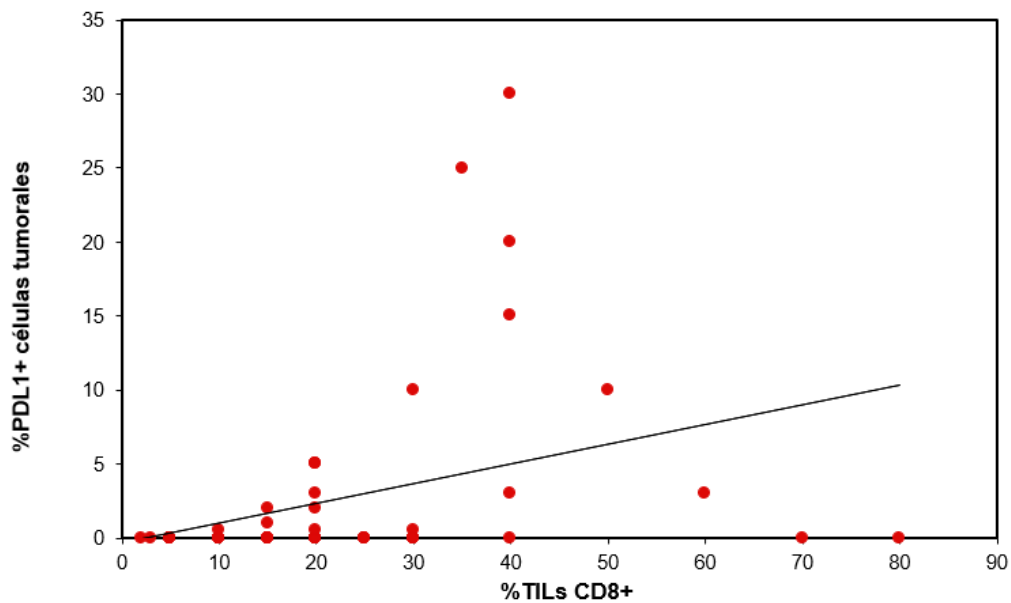
$\chi^2= 3,21$; $p=0,0732$

En nuestra serie hemos encontrado 30 casos (61%) que presentan tinción PD-L1 positiva en TILs CD8+ frente a 17 (35%) que presentan positividad en linfocitos T CD8+ peritumorales:

	PD-L1+	PD-L1-	TOTAL
TILs CD8+	30	19	49
Linfocitos CD8+ peritumorales	17	32	49

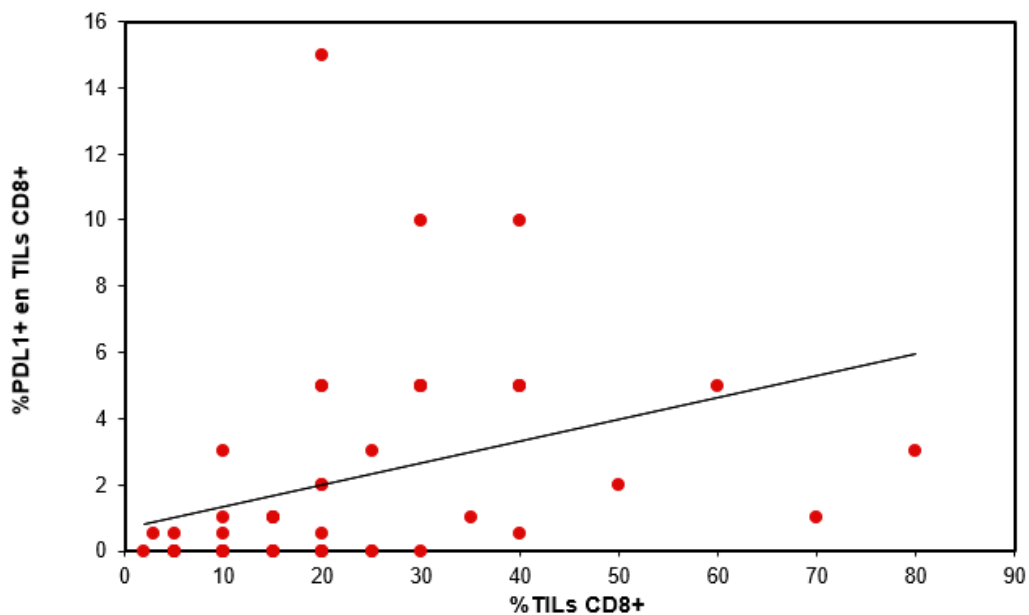
$\chi^2=6,91$; $p<0,01$

Aplicamos un estudio de coeficiente de correlación de Spearman para valorar la asociación entre la positividad de PD-L1 en células tumorales y la presencia de TILs CD8+. Obtenemos un valor de $\rho=0,447$; $p<0,01$, lo cual indica la existencia de una asociación positiva moderada entre ambas variables:



$\rho=0,447$; $p<0,01$

Aplicamos de nuevo un estudio de coeficiente de correlación de Spearman para valorar la asociación entre la positividad de PD-L1 y CD8 en los linfocitos intratumorales. Obtenemos un valor de $\rho=0,581$; $p<0,0001$, lo cual indica la existencia de una asociación positiva moderada entre ambas variables:



$\rho=0,581$; $p<0,0001$

DISCUSIÓN

Mikami et al.¹⁸, al igual que nosotros, encontraron una mayor expresión de PD-L1 en las células tumorales en los casos de CCRCC de mayor grado histológico, y ellos además encontraron esta misma tendencia en las células inflamatorias intra y peritumorales (ellos incluyeron a todos los leucocitos en este grupo, a diferencia de nosotros, que sólo estudiamos la expresión en linfocitos CD8+), mientras que en nuestra serie esto último no resulta estadísticamente significativo, probablemente por presentar un tamaño muestral insuficiente. Esta tendencia a expresar mayor PD-L1 tanto en el tumor como en su microambiente según aumenta su grado histológico corrobora la importancia de la evasión inmune en la progresión y supervivencia tumoral, ya que en la evolución natural del cáncer se va produciendo una acumulación de neoantígenos de superficie aberrantes potencialmente inmunogénicos, con los que la célula cancerosa ha de ir esquivando la respuesta inmunitaria del huésped (en algunos casos como éstos, mediante el aumento de expresión de proteínas inhibidoras de la respuesta inmune).

Callea et al.¹⁹ estudiaron 53 casos de CCRCC de grados histológicos 3 y 4 y sus respectivas metástasis y encontraron una asociación entre la positividad de PD-L1 en células tumorales y un mayor grado histológico ($p < 0.01$). Ellos, al igual que nosotros en nuestros casos de alto grado, también observaron que en la mayoría de las muestras PD-L1+ en células tumorales el porcentaje con tinción positiva era bajo y sólo el 11% de sus casos presentaron un porcentaje de positividad mayor al 5%, mientras que en nuestra serie el 19% (5 de 26) de los casos con células tumorales PD-L1+ de alto grado presentó una tinción positiva en más del 5% de su superficie tumoral. Tanto en su estudio como en el nuestro aparecieron una mayor cantidad de casos con tinción PD-L1 negativa tanto en células inflamatorias infiltrantes del tumor como en células propiamente tumorales en el grupo de bajo grado (48% en los casos de bajo grado frente al 19% en los casos de alto grado en nuestra muestra).

Zhu et al.²⁰ en 135 casos de CCRCC primario encontraron una asociación positiva entre el grado de expresión de PD-L1 en células tumorales de CCRCC y la infiltración tumoral por linfocitos T CD8+ de magnitud similar a la encontrada en nuestra serie ($r = 0,505$; $p < 0,001$ en su estudio frente a $\rho = 0,447$; $p < 0,01$ en el nuestro). Nosotros, además, encontramos una asociación paralela entre la expresión de PD-L1 y CD8 en los TILs ($\rho = 0,581$; $p < 0,0001$), pudiendo, por tanto, utilizar potencialmente el CD8 como marcador subrogado de PD-L1. Ellos, sin embargo no encontraron una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de PD-L1 en células tumorales y el grado histológico del tumor ($p = 0,261$), al contrario que nosotros ($p < 0,01$).

La presencia en nuestra serie de más casos presentando positividad de PD-L1 en TILs que en linfocitos peritumorales nos sugiere una implicación en la actividad antitumoral mayor en los primeros, ya que es probable que una gran parte del infiltrado linfocitario peritumoral corresponda a una quimiotaxia inflamatoria inespecífica, mientras que en los linfocitos dispuestos entre las células tumorales el estímulo atrayente seguramente tenga relación con los antígenos tumorales identificados por el sistema inmunitario del huésped.

CONCLUSIÓN

En nuestro estudio se ha corroborado la expresión de la proteína inhibidora de la respuesta inmune PD-L1 en las células tumorales y en los linfocitos del microambiente tumoral del carcinoma de células renales de célula clara.

Se ha encontrado una correlación positiva entre la expresión de PD-L1 en células tumorales y el grado histológico del tumor ($p < 0,01$).

No se ha encontrado una correlación estadísticamente significativa entre la expresión de PD-L1 en linfocitos CD8+ intratumorales y peritumorales en relación al grado histológico del tumor ($p = 0,2213$ y $p = 0,0732$ respectivamente).

Se ha encontrado una mayor expresión de PD-L1 en linfocitos CD8+ intratumorales que en los peritumorales ($p < 0,01$).

Se ha visto una correlación positiva entre la expresión de PD-L1 en células tumorales y la presencia de TILs CD8+ ($p < 0,01$).

Se ha constatado una asociación positiva entre la expresión de PD-L1 y CD8 en los linfocitos intratumorales ($p < 0,0001$), pudiendo potencialmente utilizarse éste como un marcador subrogado de PD-L1 en el CCRCC.

Todos estos datos podrían resultar útiles en un futuro a la hora de valorar la indicación de tratamiento inmunoterápico con anticuerpos anti-PD-L1 en pacientes con carcinoma de células renales de célula clara.

REFERENCIAS

1. Capitanio U, Bensalah K, Bex A, Boorjian SA, Bray F, Coleman J, Gore JL, Sun M, Wood C, Russo P. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol*. 2019;75(1):74-84.
2. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 1982;6(7):655-663.
3. Delahunt B, Cheville JC, Martignoni G, Humphrey PA, Magi-Galluzzi C, McKenney J, et al.; Members of the ISUP Renal Tumor Panel. The International Society of Urological Pathology (ISUP) grading system for renal cell carcinoma and other prognostic parameters. *Am J Surg Pathol*. 2013;37:1490-1504.
4. Suzanne L. Topalian, M.D., F. Stephen Hodi, M.D., Julie R. Brahmer, M.D., Scott N. Gettinger, M.D., David C. Smith, M.D., David F. McDermott, M.D., John D. Powderly, M.D. et al., Richard D. Carvajal, M.D., Jeffrey A. Sosman, M.D., Michael B. Atkins, M.D., Philip D. Leming, M.D., David R. Spigel MD. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(26):2443–2454.
5. A. Morales, D. Eidinger, A.W. Bruce. Intracavitary Bacillus Calmette-guerin in the Treatment of Superficial Bladder Tumors. *J Urol*. 1976. 116(2):180-183
6. Kamimura N, Wolf AM, Iwai Y. Development of Cancer Immunotherapy Targeting the PD-1 Pathway. *J Nippon Med Sch*. 2019;86(1):10-14
7. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, Thompson CB, Griesser H, Mak TW. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CTLA-4. *Science* 1995; 270(5238):985-988.
8. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 1999; 11(2):141-151.
9. Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, Nakatani K, Hara M, Matsumori A, Sasayama S, Mizoguchi A, Hiai H, Minato N, Honjo T. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD1 receptor-deficient mice. *Science* 2001; 291(552); 291:319-322
10. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbé C, Peschel C, Quirt I, Clark JL, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urba WJ. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010; 363(8):711-723.
11. Pardoll. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):252-64.
12. Syn NL, Teng MWL, Mok TSK, Soo RA. De-novo and acquired resistance to immune checkpoint targeting. *Lancet Oncol*. 2017;18(12):e731-e741.

13. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*. 1992;11(11):3887-3895.
14. Tie Y, Ma X, Zhu C, Mao Y, Shen K, Wei X, Chen Y, Zheng H. Safety and efficacy of nivolumab in the treatment of cancers: A meta-analysis of 27 prospective clinical trials. *Int J Cancer*. 2017;140(4):948-958
15. Bellmunt J, Powles T, Vogelzang NJ. A review on the evolution of PD-1/PD-L1 immunotherapy for bladder cancer: The future is now. *Cancer Treat Rev*. 2017;54:58-67.
16. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, Sosman JA, McDermott DF, Powderly JD, Gettinger SN, Kohrt HE, Horn L, Lawrence DP, Rost S, Leabman M, Xiao Y, Mokatrín A, Koeppen H, Hegde PS, Mellman I, Chen DS, Hodi FS. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*. 2014;515(7528):563–567.
17. Teng MW, Ngiow SF, Ribas A, Smyth MJ. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Res*. 2015;75(11):2139-2145.
18. Mikami S, Mizuno R, Kondo T, et al. Clinical significance of programmed death-1 and programmed death-ligand 1 expression in the tumor microenvironment of clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2019;110(6):1820-1828
19. Callea M, Albiges L, Gupta M, Cheng SC, Genega EM, Fay AP, Song J, Carvo I, Bhatt RS, Atkins MB, Hodi FS, Choueiri TK, McDermott DF, Freeman GJ, Signoretti S. Differential Expression of PD-L1 between Primary and Metastatic Sites in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Immunol Res*. 2015;3(10):1158-64.
20. Zhu, Cai MY, Weng DS, Zhao JJ, Pan QZ, Wang QJ, Tang Y, He J, Li M, Xia JC. PD-L1 expression patterns in tumour cells and their association with CD8+ tumour infiltrating lymphocytes in clear cell renal cell carcinoma. *J Cancer*. 2019;10(5):1154-1161.